

Diagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine : problèmes et nouveaux développements

L. DEDIEU, A. BRÉARD, C. LE GOFF et P.-C. LEFÈVRE *

Résumé : *Le diagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine (PPCB), s'il est aisé pour un animal en phase clinique aiguë, est plus délicat dans les formes subaiguës ou chroniques. Le recours au laboratoire est indispensable pour confirmer toute suspicion de PPCB. Les méthodes classiques de diagnostic (isolement, culture, tests biochimiques et sérologiques) manquant de spécificité et de sensibilité, il était nécessaire de les améliorer. Par ailleurs, l'évolution des techniques de biologie moléculaire a permis le développement de nouveaux tests. Ceux basés sur l'amplification en chaîne par polymérase (polymerase chain reaction : PCR) ou sur les techniques immuno-enzymatiques (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) couplées aux anticorps monoclonaux sont parmi les plus importants. L'application de ces techniques à la PPCB présente de nombreux avantages et a considérablement amélioré la spécificité et la sensibilité du diagnostic.*

MOTS-CLÉS : Amplification en chaîne par polymérase – Diagnostic – Epreuve immuno-enzymatique – Maladies des bovins – *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC – Péripneumonie contagieuse bovine.

INTRODUCTION

La péripneumonie contagieuse bovine est une maladie déroutante tant sur le plan du diagnostic que de la prophylaxie médicale. En épidémiologie, le danger repose sur les formes subaiguës ou chroniques qui maintiennent l'infection dans un troupeau ou une région pendant plusieurs années. Le diagnostic doit toujours être confirmé par le laboratoire. Il importe donc que les techniques mises en œuvre soient fiables, rapides et de réalisation aisée. Le but de cet article est d'exposer brièvement les progrès réalisés dans ce domaine au cours des dernières années.

* Laboratoire PATHOTROP, Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Département d'élevage et de médecine vétérinaire (CIRAD-EMVT), Centre d'application de méthodologies pour le diagnostic des maladies animales (CAMDA) de l'Office international des épizooties (OIE), Campus international de Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, B.P. 5035, 34032 Montpellier Cedex 1, France.

DÉFINITION

La péripneumonie contagieuse bovine ou PPCB est une maladie contagieuse, due à *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides small colony* (Mmm SC), qui touche les bovins domestiques et se caractérise, sur le plan anatomo-pathologique, par une inflammation exsudative séro-fibrineuse du poumon et de la plèvre. Toutefois, si la PPCB est une mycoplasmosse primitive, un certain nombre de facteurs peuvent influencer sur l'apparition et la gravité des symptômes, facteurs qui compliquent le diagnostic clinique et dont il faut tenir compte lors de l'étude d'un foyer. L'âge joue un rôle déterminant puisque les symptômes pulmonaires s'observent uniquement chez les adultes tandis que les jeunes ne présentent que des atteintes articulaires. De même, les facteurs individuels sont prépondérants puisque dans un foyer de maladie naturelle, seulement 30 à 40 % des animaux extériorisent la maladie sans que l'on puisse expliquer ces variations (Tableau I).

TABLEAU I
*Variation de la réceptivité lors d'un foyer de péripneumonie
contagieuse bovine*
(30)

Formes cliniques	Fréquence (%)
Forme suraiguë	13
Forme aiguë	20
Forme subclinique	46
Animaux résistants	21

Le même phénomène s'observe lors de reproductions expérimentales mais avec des fréquences différentes, notamment pour les résistants qui ne représentent plus que 9 % des animaux. Le mode d'élevage aussi joue un rôle puisqu'en Afrique l'infection semble se maintenir plutôt dans les troupeaux nomades que chez les sédentaires.

SIGNES CLINIQUES ET DIFFICULTÉS DU DIAGNOSTIC

Les manifestations cliniques de la PPCB ont été amplement décrites dans nombre de synthèses (6, 13, 30, 39).

Durée d'incubation

La durée de l'incubation varie de 20 jours à plus de 4 mois (Tableau II).

Manifestations cliniques chez les adultes

Seules la forme aiguë et la forme suraiguë autorisent un diagnostic clinique. Les formes subcliniques, plus communes, posent un réel problème de diagnostic.

TABLEAU II
Durée d'incubation de la péripneumonie contagieuse bovine
 (30)

Durée de l'incubation	Fréquence (%)
de 20 à 30 jours	46
de 31 à 40 jours	23
de 41 à 60 jours	11
de 61 à 120 jours	20

Classiquement, on distingue trois phases dans l'évolution de la forme aiguë : la phase d'invasion ou phase congestive, la phase d'état ou phase d'hépatisation et d'installation de la pleurésie et enfin la phase terminale.

La phase d'invasion, d'une durée de cinq jours, se traduit par une hyperthermie peu marquée, irrégulière, parfois absente, de la polypnée (jusqu'à 30 mouvements par minute) et une plainte qui s'exprime quand l'animal se lève ou que l'on percute le flanc avec le poing. L'animal prend une attitude (dite d'orthopnée) qui sera de plus en plus manifeste avec le temps : dos voussé et membres antérieurs écartés. Une toux caractéristique du développement d'une pleuropneumonie s'installe : petite, sèche, avortée.

La phase d'état qui n'excède pas quatre à cinq jours suit avec installation de la fièvre (entre 40 °C et 42 °C), abattement profond, inrumination et anorexie. La respiration devient dyspnéique avec discordance et entrecouplement. La toux devient plus grasse et la plainte expiratoire plus nette. A l'auscultation, on décèle des zones de silence correspondant aux zones de matité pulmonaire et des râles humides et crépitants dans les foyers de pneumonie. La percussion révèle aisément la ligne horizontale traduisant la limite supérieure de la zone de matité correspondant à la pleurite exsudative.

La phase terminale évolue soit vers une aggravation des symptômes et la mort par asphyxie de l'animal avec un tableau de détresse respiratoire (naseaux dilatés, encolure en extension, écume autour des naseaux et de la bouche), soit vers la guérison avec régression lente des symptômes et des lésions, régression qui n'est jamais totale et qui peut donner naissance à des séquestres et des symphyses pleurales. La guérison n'est pas rare, notamment après plusieurs mois d'évolution du foyer, puisque le taux de létalité varie de 15 à 30 %.

La forme suraiguë est caractérisée par une évolution rapide, en moins d'une semaine, vers la mort par asphyxie (production intense de « lymphé » péripneumonique) ou défaillance cardiaque (péricardite exsudative).

La forme subclinique ou subaiguë est souvent inapparente, le seul signe étant une baisse de la production laitière ou un amaigrissement associé à une hyperthermie faible et inconstante et une toux discrète. Le retour à la normale se fait en deux à trois semaines. Cette forme est de loin la plus dangereuse au plan épidémiologique.

Tous les symptômes décrits dans la forme aiguë ne sont pas observables chez un seul animal et il convient d'ausculter le plus grand nombre d'animaux pour dresser un tableau clinique complet et identifier toutes les formes. Par ailleurs, ce tableau clinique évolue dans le temps au sein d'un foyer. Les formes aiguës et suraiguës sont plus

fréquentes en début d'épizootie avec des taux de mortalité plus élevés qu'en fin d'évolution, où les cas de guérison sont de règle. On parle alors de gravité régressive de la maladie, synchrone de son apparition dans le troupeau ou la région. Ces variations sont vraisemblablement dues à une différence de sensibilité des animaux.

Manifestations cliniques chez les jeunes

Chez les jeunes, l'atteinte pulmonaire est rare tandis que l'atteinte articulaire est de règle. Elle s'accompagne de complications cardiaques telles qu'endocardites et myocardites. Dans un foyer en évolution, l'auscultation des jeunes est indispensable car elle permet des prélèvements aisés de liquides synoviaux riches en mycoplasmes. La présence concomitante de symptômes pulmonaires chez les adultes et d'atteintes articulaires chez les jeunes renforce la suspicion de PPCB dans un troupeau.

LÉSIONS ET INTÉRÊT DU DIAGNOSTIC NÉCROPSIQUE

Autant le diagnostic clinique est délicat, voire impossible (présence de formes subaiguës et petit nombre d'animaux extériorisant la maladie), autant le diagnostic nécropsique est relativement aisé.

Lors d'atteinte récente, la pleurésie exsudative est évocatrice : exsudat séro-fibrineux jaune ambré, parfois teinté de sang, souvent abondant, coagulant à l'ouverture de la cage thoracique pour former des « omelettes » de fibrine. La lésion pulmonaire est unilatérale (très rarement bilatérale) et caractérisée par une hépatisation franche associée à un épaississement des travées interlobulaires dû à une infiltration de sérosité qui s'écoule à la coupe. Dans les formes plus anciennes, différents stades d'hépatisation entraînent une coloration des lobules variant du rouge sombre au gris en passant par le jaune et donnant ainsi un aspect marbré, dit aussi en « fromage de tête ». Les séquestres de taille variable (de la taille d'une bille à celle d'un pamplemousse) qui apparaissent chez un certain nombre d'animaux guéris résultent d'une nécrose du parenchyme pulmonaire donnant naissance à un amas caséeux, parfois liquéfié, enchâssé dans une épaisse gangue fibreuse. A ces lésions sont associées une hypertrophie des ganglions bronchiques et parfois une péricardite exsudative. Dans les formes chroniques ou anciennes, une pachypleurite et des adhérences entre les plèvres sont de règle.

Une bonne connaissance des lésions de la PPCB est primordiale : non seulement des autopsies réalisées dans un foyer permettent de confirmer la suspicion clinique mais, en outre, l'examen des carcasses aux abattoirs ou sur les aires d'abattage est un moyen sûr de dépister la maladie si elle est passée inaperçue du clinicien.

DIAGNOSTIC DIFFÉRENTIEL

Il n'est guère possible de distinguer cliniquement la PPCB d'une autre bronchopneumonie ou pleuropneumonie due à des infections virales et/ou bactériennes. Seul le contexte épidémiologique peut alerter le clinicien qui devra recourir à l'autopsie. Lors d'autopsies, le diagnostic est aisé même si une confusion est possible avec les lésions de la pasteurellose bovine (aspect marbré identique mais

atteinte bilatérale des poumons) et celles de la theilériose à *Theileria parva* ou *East coast fever* (œdème et dilatation des travées interlobulaires mais sans pleurésie ni hépatisation).

Dans tous les cas, le recours au laboratoire est donc indispensable.

DIAGNOSTIC EXPÉRIMENTAL

Le diagnostic des maladies infectieuses repose sur la mise en évidence de l'agent ou de certains de ses constituants (diagnostic direct) ou sur la mise en évidence des éléments de la réponse immunitaire induite par les antigènes portés par cet agent (diagnostic indirect). Le diagnostic direct est basé sur des caractères phénotypiques (caractères morphologiques, biologiques, biochimiques, physiologiques, etc.) ou des caractères génotypiques (détection de polymorphisme au niveau des acides nucléiques). Le diagnostic indirect est obtenu par l'utilisation de tests sérologiques mettant en évidence la présence d'anticorps dans le sérum de l'animal. D'autres tests sérologiques (tests d'inhibition de croissance et d'immunofluorescence) relèvent du diagnostic direct puisqu'ils détectent *Mmm* SC dans les échantillons grâce à des anticorps spécifiques, de même que certaines épreuves immuno-enzymatiques (*enzyme-linked immunosorbent assay* : ELISA) dites « de capture » ou « sandwich ». Généralement les tests biochimiques et sérologiques (inhibition de croissance et immunofluorescence) suffisent à l'identification du mycoplasme en cause ; toutefois, dans le cas de *Mmm* SC, son appartenance au groupe *mycoides*, groupe caractérisé par de nombreuses réactions croisées et antigènes communs entre les membres, complique nettement cette identification.

Les récents développements de la biologie moléculaire laissent espérer la mise au point de nouveaux tests de diagnostic pour la PPCB ou l'amélioration (meilleures spécificité, sensibilité, rapidité) de ceux déjà existants.

La section suivante décrira tout d'abord brièvement les techniques classiques d'identification de *Mmm* SC en présentant leurs avantages et inconvénients puis les nouveaux tests récemment développés, issus des progrès réalisés en biotechnologie.

DIAGNOSTIC DIRECT

Les prélèvements

Prélèvements sur l'animal vivant

Dans les formes aiguës, les prélèvements à effectuer sont le *sang* pour la mise en évidence d'antigènes circulants tels que le galactane ou d'anticorps précoces et la *lymphe péripneumonique* par ponction intercostale (entre la 7^e et la 8^e côte) en région déclive pour l'application des techniques de bactériologie classique et de l'amplification en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction* : PCR). Il est à noter, dans le cas de la PCR, que les prélèvements liquides tels que ceux de lymphe péripneumonique peuvent être conservés et traités sous forme de papier filtre imbibé de l'échantillon. Les prélèvements ainsi recueillis sur le terrain peuvent être préparés de cette façon. Chaque bandelette de papier filtre sera enveloppée d'un sachet plastique

pour être isolée des autres. Elles peuvent être ainsi facilement envoyées par la poste au laboratoire pratiquant cette technique de PCR.

Le *mucus nasal* peut être prélevé sur écouvillon stérile mais sa richesse en mycoplasmes est très variable. L'écouvillon sera maintenu dans un milieu liquide pour éviter tout dessèchement (30). Dans les formes chroniques, des prélèvements de *sang* seront effectués pour la réalisation des tests sérologiques.

Prélèvements sur cadavre

Sur le cadavre, les mêmes types d'échantillons seront prélevés, plus facilement et dans de bonnes conditions d'asepsie. Il convient, bien entendu, d'ajouter des *fragments de lésions pulmonaires* et des *ganglions lymphatiques*.

Les milieux de culture

En raison de la faible taille de leur génome et donc de leur capacité codante réduite, les mycoplasmes sont très exigeants en éléments nutritifs et nécessitent l'addition, dans leurs milieux de culture, de nombreux précurseurs leur permettant de synthétiser les macromolécules indispensables.

Les milieux de culture devront toujours contenir :

- un milieu de base constitué d'un extrait de viande (infusion de cœur de bœuf, par exemple) ou d'une peptone (Tryptose Difco, Tryptone Difco ou Oxoid) ou les deux à la fois ;
- un extrait ou un autolysat de levure de bière, apportant les facteurs de croissance ;
- un sérum dans la proportion de 10 à 20 %. La proportion de 10 % favorise l'apparition des « comètes » (39). Le choix de l'animal donneur et la préparation du sérum ont été décrits (30).

Tous les milieux de culture ont été précédemment décrits (30). L'addition de glucose, d'un système tampon, d'acide désoxyribonucléique (ADN) et de glycérol peut améliorer la croissance de *Mmm* SC (20).

Au moment de l'isolement, il est obligatoire d'ajouter des inhibiteurs bactériens : acétate de thallium de 1/5 000 à 1/10 000 (en concentration finale), pénicilline G de 250 à 1 000 UI/ml de milieu et fungizone (amphotéricine) à 5 µg/ml si une contamination fongique est suspectée.

Les milieux de culture sont soit liquides soit solides (par adjonction de 15 g/l d'agar). Les milieux liquides, après addition d'extrait de levures et de sérum, sont stérilisés par filtration. Les milieux gélosés sont autoclavés et, après refroidissement à 55 °C, le sérum, l'extrait de levure et les inhibiteurs sont ajoutés.

Isolement et purification des souches

L'isolement doit être effectué le plus rapidement possible.

Les milieux solides sont ensemencés avec quelques gouttes d'échantillon (liquide pleural, lymphé péricapneumonique ou broyat de poumon) ou par empreintes réalisées à la surface de la gélose à partir de sections de poumons ou de ganglions.

Les milieux liquides sont ensemencés selon la méthode de la dilution pastorienne (30).

Les cultures de mycoplasmes étant relativement lentes, une incubation de plusieurs jours à 37 °C en tubes hermétiquement fermés est nécessaire. Les milieux gélosés sont incubés en présence de 80 % d'humidité afin d'éviter la dessiccation. La présence de CO₂ n'est pas nécessaire.

Les colonies observées sont clonées par transfert dans un tube de milieu de culture d'un bloc de gélose portant une colonie isolée. En cas de contamination d'une culture liquide, une filtration sur disques de 0,45 µ ou 0,22 µ de porosité devrait éliminer toute bactérie qui n'est pas un mycoplasme. Si différentes colonies sont observées sur une même boîte, par exemple en présence d'une contamination par *M. arginini*, elles peuvent être isolées simultanément par trois purifications successives. Les formes L sont éliminées après deux à trois sous-cultures par suppression des inhibiteurs bactériens (25). L'arrêt de la pénicilline permet également à la bactérie de reprendre sa forme d'origine, ce qui la rend plus facilement détectable.

Culture, coloration et diagnostic direct

Un examen préliminaire des cultures met en évidence des filaments soyeux et fragiles appelés « comètes » qui partent de la surface du liquide et se développent en profondeur. Ce phénomène n'est observé qu'avec les souches de *Mmm* SC et celles de *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae*, l'agent de la pleuropneumonie contagieuse caprine (PPCC) (30).

L'examen microscopique des mycoplasmes peut être fait à partir d'une culture jeune en utilisant un système à contraste de phase ou à fond noir (31). Un prélèvement de lymphes ou d'exsudat bronchique peut également être observé par cette technique, si l'observateur est entraîné.

Les mycoplasmes peuvent également être observés après coloration. La technique de May-Grünwald Giemsa est la plus fréquemment utilisée (30, 31). Les échantillons biologiques sont rarement observés directement après coloration car le caractère pléomorphe des mycoplasmes peut entraîner des confusions avec divers débris cellulaires.

La technique d'immunofluorescence, qui présente une bonne spécificité, peut être utilisée directement sur les produits pathologiques, mais là encore l'observation nécessite un œil entraîné (26, 30). Elle peut être directe (l'antisérum utilisé étant conjugué à un fluorochrome) ou indirecte (même réaction que précédemment mais la révélation se fait grâce à un second antisérum, réagissant avec le premier, et portant le conjugué). La méthode directe est plus rapide mais moins spécifique que la méthode indirecte. Dans tous les cas, le sérum négatif, celui de référence et l'immunsérum devront être calibrés avant l'utilisation (30, 31).

L'examen des cultures sur milieu gélosé fait apparaître la structure typique des colonies de mycoplasmes. Dans les cas douteux, la colonie peut être colorée par la technique de Dienes (30).

Un test à l'immunoperoxydase a également été développé pour colorer les colonies non fixées sur la gélose (27). L'antisérum utilisé dans ce test n'étant pas spécifique de *Mmm* SC, un résultat positif n'indique que l'appartenance au groupe *mycoides*.

Identification d'espèce

Les tests décrits ci-dessous sont ceux classiquement utilisés pour l'identification de *Mmm* SC.

Le test à la digitonine

Ce test permet la distinction entre les mycoplasmes, sensibles à la digitonine, et les acholéplasmes, résistants (10, 30).

Les tests biochimiques

Les caractères biochimiques de *Mmm* SC figurent au Tableau III.

TABLEAU III
Caractères biochimiques de Mycoplasma mycoides subsp. mycoides SC
(30)

Test biochimique	Résultat
Films et spots	—
Fermentation du glucose	+
Réduction des sels de tétrazolium	+ (en aérobiose et anaérobiose)
Hydrolyse de l'arginine	—
Hydrolyse des phosphates	—
Pouvoir protéolytique	— ou faible
— : négatif	+ : positif

Tous les tests biochimiques ont été décrits précédemment (30).

Le problème d'identification de ce mycoplasme est dû au fait qu'il n'est pas le seul à présenter ces caractéristiques biochimiques. Le biotype caprin, *M. mycoides* subsp. *mycoides large colony* (*Mmm* LC), par exemple, appartenant également au groupe *mycoides*, possède les mêmes caractères, ce qui rend difficile la différenciation entre les deux biotypes. Ceux-ci se distinguent par une différence de métabolisme, celui de *Mmm* LC étant plus actif que celui de *Mmm* SC. Les souches appartenant au biotype caprin présentent un taux de croissance rapide, des colonies de grande taille, une digestion de la caséine, une liquéfaction du sérum coagulé et une survie plus longue à 45 °C. Contrairement à celles de *Mmm* SC, les souches de *Mmm* LC fermentent le sorbitol, sont plus résistantes à la streptomycine et sont caractérisées par la présence de deux enzymes : une alpha-glucosidase et une ornithine-transcarbamylase (20).

Pour obtenir une identification définitive, il est donc nécessaire d'utiliser des techniques sérologiques telles que le test d'inhibition de croissance avec un immunosérum de référence et le test d'immunofluorescence directe ou indirecte (30).

Test d'inhibition de croissance

Ce test, qui dérive de la technique mise au point par Clyde (5), a été longuement décrit par Provost et coll. (30). Il consiste à cultiver des mycoplasmes sur gélose en présence d'immunosérum spécifique déposé dans des puits creusés dans la gélose. Après 48 à 72 heures d'incubation, le diamètre d'inhibition est mesuré. Une zone d'inhibition de 2 mm au moins doit être considérée comme positive.

Le problème de la distinction entre *Mmm* LC et *Mmm* SC reste posé. Perreau (24) a démontré qu'il était possible de différencier ces deux biotypes en employant des sérums de bovins naturellement infectés. De même, Rosendal (33) base leur différenciation sur l'utilisation de complément de cobaye.

Test d'immunofluorescence

Ce test vient en complément du test d'inhibition de croissance. Il est effectué sur des colonies entières sur blocs de gélose, non fixées, le plus souvent par la méthode indirecte, plus longue mais plus spécifique. L'utilisation d'un sérum négatif de contrôle est nécessaire. Les sérums doivent avoir été préalablement titrés et seront utilisés à une dilution éliminant des croisements éventuels inter-espèces et non spécifiques. Pour un observateur averti, l'intensité de fluorescence (– à 4 +) permet de faire la différence entre la sous-espèce *M. mycoides* subsp. *mycoides* et d'autres mycoplasmes. Néanmoins, le problème de la distinction entre *Mmm* LC et *Mmm* SC demeure et pourra être résolu, comme pour l'inhibition de croissance, par l'utilisation d'un sérum provenant d'un bovin atteint de PPCB naturelle. Avec cette technique appliquée à 266 empreintes de poumons issus d'un troupeau naturellement infecté, Trichard et coll. (38) ont obtenu des résultats plus rapides et plus sensibles que par culture. La méthode a été améliorée par une contre-coloration au noir Eriochrome.

D'autres tests, moins utilisés, basés sur la détection d'un antigène spécifique de *Mmm* SC par un immunsérum précipitant spécifique ont également été décrits (30). Cet antigène est le galactane, normalement réparti à la surface de la bactérie mais qui diffuse largement dans le corps de l'animal (sérum, lymph, liquide pulmonaire, liquide péricardial, urine, etc.) pendant la phase clinique de la maladie. Ces tests comprennent le test d'immunodiffusion double en gélose (29, 36, 41) et le test de précipitation interfaciale en milieu liquide (40). Ces tests présentent une efficacité limitée, le galactane n'étant facilement mis en évidence que pendant la phase d'état de la maladie.

Avantages et inconvénients des tests précédents

Les tests décrits ci-dessus présentent l'avantage de pouvoir être pratiqués dans tout laboratoire, sans nécessiter d'équipement sophistiqué. Cependant, ils présentent également de nombreux inconvénients. L'observation directe en microscopie des mycoplasmes dans un prélèvement biologique, que ce soit par coloration ou par immunofluorescence, reste limitée à un personnel bien entraîné et donc à un laboratoire compétent. Les tests biochimiques ne sont pas spécifiques de *Mmm* SC en raison des nombreuses réactions croisées existant entre les membres du groupe *mycoides*. L'existence de nombreux antigènes communs à ces mycoplasmes complique également l'identification par inhibition de croissance ou par immunofluorescence. Ces tests sérologiques n'étant pas d'une très grande sensibilité, aucun d'eux ne peut, à lui seul, détecter un animal infecté quel que soit le stade clinique de la maladie. De plus, aucun de ces tests ne résout le problème de détection des porteurs chroniques. Ils présentent également un autre inconvénient : ils doivent être réalisés sur culture pure et nécessitent donc un isolement préalable du germe. Aucun d'entre eux ne permet donc une identification directe et rapide du mycoplasme au sein du prélèvement.

Par conséquent, il est indispensable de développer :

- un test simple, rapide, spécifique et sensible, utilisable sur le terrain par des laboratoires ne disposant pas d'équipement sophistiqué ;

- un test unique pour la détection de l'agent de la PPCB et efficace quel que soit le stade de l'infection ;
- un test applicable directement sur l'échantillon.

Diagnostic direct : développements récents

L'évolution rapide de la biologie moléculaire ces dernières années a conduit à la mise au point de nouvelles techniques (développement d'anticorps monoclonaux ; immunocapture ; immunoélectrophorèse ; hybridation d'acides nucléiques ; clonage moléculaire ; séquençage ; amplification en chaîne par polymérase, etc.) qui ont entraîné le développement de nouveaux tests de diagnostic.

Tests de diagnostic basés sur la détection de protéines

Immunoblot sur membranes filtrantes

Une technique d'immunoblot a été développée pour l'identification des mycoplasmes des ruminants (28). Le test de l'immunoblot sur membranes filtrantes (*membrane filtration dot* : MF dot) s'effectue à partir d'une culture de mycoplasmes ; il nécessite donc, lui aussi, l'isolement préalable du germe. Ce test utilise des microplaques spéciales à 96 puits constitués de membranes filtrantes durapore de 0,22 μm . Les cultures de mycoplasmes sont directement filtrées sous vide à travers ces membranes. Un antisérum polyclonal spécifique est ensuite ajouté et le complexe mycoplasme-anticorps est révélé par un anticorps anti-immunoglobuline couplé à une peroxydase. L'addition du substrat met en évidence les réactions positives par le développement d'une coloration. Le test s'effectue en deux à trois heures et nécessite de faibles quantités de sérum hyperimmun. Il présente une bonne spécificité non seulement avec les cultures fraîches mais également avec les cultures plus âgées. Selon la méthode utilisée, il fournit un résultat qualitatif ou quantitatif. La spécificité du MF dot est équivalente à celle obtenue par les tests d'inhibition de croissance ou d'immunofluorescence, excepté pour quelques faibles réactions croisées entre *M. bovis* et *M. agalactiae* ou entre *M. capricolum* et *M. mycoides*. Cependant, il ne permet pas de différencier les deux biotypes *Mmm* SC et *Mmm* LC. Le MF dot offre en revanche certains avantages : il est pratique, rapide, facile à standardiser et permet le traitement simultané de nombreux échantillons. Sa sensibilité varie de $2,10^4$ à $8,10^6$ mycoplasmes par puits, selon le sérum utilisé. Le principal inconvénient de ce test est la nécessité de cultiver préalablement le mycoplasme, le diagnostic ne pouvant intervenir qu'après quelques jours.

Test d'immunocapture

Le développement des techniques immuno-enzymatiques et des anticorps monoclonaux a permis la mise au point de tests d'immunocapture ou d'ELISA « sandwich ». Ils reposent sur la mise en évidence de déterminants antigéniques portés par l'agent recherché, au moyen d'anticorps spécifiques marqués par des enzymes destinées à révéler la formation des complexes antigènes-anticorps.

Un test d'immunocapture, basé sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques de *Mmm* SC, a été développé (C. Le Goff, résultats non publiés). L'un des anticorps sert à la capture de l'antigène, le second se fixe sur le complexe anticorps-antigène formé et permet sa détection. Ce test est rapide et présente une bonne spécificité et une bonne sensibilité lorsqu'il est effectué sur des culots de germes

obtenus après culture. Cependant, ce test est en cours d'amélioration afin d'être utilisable directement dans les produits pathologiques.

Brocchi et coll. (2) ont mis au point un test ELISA « sandwich », dont la spécificité varie en fonction de la paire d'anticorps monoclonaux sélectionnée pour la réaction. La seule combinaison réagissant spécifiquement avec *Mmm* SC, après culture, présente une plus faible sensibilité et ne permet pas la détection de *Mmm* SC lorsque le test ELISA est utilisé directement à partir des prélèvements. Les deux autres paires d'anticorps monoclonaux détectent, en revanche, toutes les souches du groupe *mycoides* avec l'avantage pour l'une d'entre elles d'être utilisable dans les échantillons pathologiques.

Un autre test ELISA « sandwich » a été développé par Rodriguez et coll. (32). Ce test présente le même problème de spécificité : les anticorps monoclonaux sélectionnés réagissent avec *Mmm* LC et *Mmm* SC et les deux biotypes ne peuvent donc pas être différenciés. De plus, ce test ne présente une bonne sensibilité que lorsqu'une étape d'enrichissement est couplée à l'immunocapture. Le prélèvement est donc incubé dans les microplaques avec l'anticorps de capture pendant 24 ou 48 heures en milieu de culture pour mycoplasmes. Deux à trois jours sont donc nécessaires avant d'obtenir le diagnostic.

Test immunocytochimique

Un test immunocytochimique, utilisant des sérums hyperimmuns, a été développé par Ferronha et coll. (9) et par Scanziani et coll. (35) pour détecter *Mmm* SC directement dans des coupes de tissus. Le complexe antigène-anticorps est révélé par le système de la peroxydase couplée aux immunoglobulines. *Mmm* SC peut ainsi être mis en évidence dans les bronchioles, les alvéoles, les travées interlobulaires ou les vaisseaux lymphatiques. La spécificité de la réaction est confirmée par l'examen qui reste négatif avec les tissus infectés par un mycoplasme du groupe *mycoides* différent de *Mmm* SC. Ce test à l'avantage d'apporter une confirmation rapide du diagnostic, cependant il ne peut être réalisé qu'après abattage. Sa validité reste à confirmer en présence de lésions chroniques.

Electrophorèse sur gel au dodécylsulfate de sodium-polyacrylamide de protéines

Comme toute bactérie, les mycoplasmes peuvent être caractérisés par leur contenu en protéines. Ces protéines sont étudiées, après extraction, par migration électrophorétique dans un gel de polyacrylamide. Leurs positions sur le gel déterminent un profil protéique, utilisé comme outil de typage d'espèce ou de souche. Ce test, comme le MF dot et le test d'immunocapture, se réalise à partir d'une culture pure de mycoplasmes et nécessite donc un isolement préalable. L'étude du profil protéique constitue, en fait, un outil supplémentaire s'ajoutant au panel déjà existant de tests réalisés sur culture, pour confirmer une identification.

Une étude des profils de protéines des mycoplasmes appartenant au groupe *mycoides* a mis en évidence un profil protéique spécifique pour *Mmm* SC. Cette technique présente donc l'intérêt de différencier le biotype caprin du biotype bovin, caractérisés chacun par un profil distinct (14).

Electrophorèse bidimensionnelle et immunoblot

Des techniques plus complexes, telles que l'électrophorèse en deux dimensions de protéines couplée à un test d'immunoblot ont également été développées.

L'immunoblot apporte une troisième dimension à l'électrophorèse bidimensionnelle, affinant, par conséquent, les différentes possibilités d'interprétation des résultats. Bien que cette technique soit plus complexe à mettre en œuvre et plus difficile à standardiser, Nicholas et Palmer (19) ont démontré son utilité pour confirmer un diagnostic dans des pays indemnes de PPCB, où peu d'animaux importés ont à être examinés en même temps.

Cependant, les résultats obtenus par d'autres auteurs indiquent que si des espèces éloignées peuvent être facilement identifiées, en revanche deux espèces ou sous-espèces très proches, telles que *Mmm* LC et *Mmm* SC, sont plus difficilement différenciées par cette technique (22).

Pour conclure sur ces méthodes basées sur la détection de protéines, les tests de MF dot, d'immunocapture ou l'épreuve ELISA « sandwich », développés principalement en tant que tests de diagnostic, restent à améliorer pour remplir les conditions décrites ci-dessus. Le test immunocytochimique est un bon outil de diagnostic mais n'est utilisable qu'après abattage. Les électrophorèses de protéines, quant à elles, constituent plutôt des outils de recherche que de diagnostic.

Tests de diagnostic basés sur les acides nucléiques

La présence d'un germe dans un échantillon peut être mise en évidence par la détection de fragments d'ADN qui lui sont spécifiques. Cette détection s'effectue soit en utilisant la technique d'hybridation moléculaire, soit par la méthode d'amplification en chaîne par polymérase (PCR). L'identification et la caractérisation de fragments d'acides nucléiques spécifiques d'espèce représentent une part importante de la recherche dans le domaine de la biologie moléculaire.

Sondes nucléiques

Le diagnostic par hybridation moléculaire est basé sur l'utilisation de sondes nucléiques correspondant à des séquences d'ADN spécifiques de groupe ou d'espèce. Ces sondes permettent de détecter un agent pathogène directement dans un prélèvement, par reconnaissance d'une séquence cible d'ADN. Pour réaliser une hybridation, les deux séquences d'ADN (sonde et cible) doivent d'abord être dénaturées, c'est-à-dire séparées en simple brin d'ADN. La deuxième étape correspond au réappariement de ces séquences d'ADN simple brin (sonde avec ADN cible) s'il y a complémentarité entre ces séquences. La technique utilisée pour révéler l'hybridation dépend du type de marquage de la sonde, qui peut être radioactif ou non (sonde froide). Dans le premier cas, la révélation se fait par impression d'un film (autoradiographie) ; dans le second cas, la mise en évidence se fait par coloration ou par chimioluminescence, par l'intermédiaire d'un anticorps reconnaissant la molécule marquant la sonde (par exemple, la digoxigénine) et d'un substrat.

Deux types de sondes différentes ont été développées pour le diagnostic de la PPCB.

La première, dénommée CAP21, a été isolée à partir du génome de *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) (37). Par conséquent, cette sonde n'est pas spécifique de *Mmm* SC et ne peut pas être utilisée pour une détection directe dans l'échantillon par hybridation. Cette sonde est, en fait, spécifique du groupe *mycoides* et permet de détecter toutes les souches lui appartenant. Dans le but d'identifier *Mmm* SC, la sonde CAP21 peut être utilisée dans une technique plus complexe : l'hybridation s'effectue sur l'ADN génomique extrait, purifié, digéré par l'enzyme de restriction *Taq*I, soumis

à une électrophorèse et transféré sur une membrane par la technique de Southern. Les profils d'hybridation ainsi obtenus permettent de différencier les membres du groupe *mycoides* et plus particulièrement *Mmm* SC, caractérisé par un profil spécifique.

La seconde sonde nucléique développée a été isolée d'une banque d'ADN génomique réalisée à partir de la souche de référence de *Mmm* SC (7). Cette sonde est donc spécifique de l'agent de la PPCB. Toutefois, lorsque le marquage est non radioactif, la sensibilité de détection est trop faible pour que la sonde puisse être utilisée dans un test d'hybridation directe sur un dépôt du prélèvement (dot blot).

Il convient également de noter l'importance du problème des bruits de fond obtenus lorsque des sondes dites « froides » sont utilisées directement sur des prélèvements.

Amplification en chaîne par polymérase

La PCR a pris un essor considérable depuis son développement, il y a une dizaine d'années. Indépendamment de l'importance que cette réaction a acquise dans le domaine du diagnostic, elle intervient dans nombre de techniques de biologie moléculaire (séquençage, détection de mutation, mutagenèse, étude de polymorphisme d'ADN, etc.).

La technique de la PCR est basée sur la répétition (25 à 35 fois) d'un cycle, constitué de trois étapes définies par une température et par la durée pendant laquelle celle-ci est maintenue. La première étape correspond à la dénaturation de l'ADN cible. La seconde est l'hybridation des amorces sur l'ADN cible et la troisième représente l'étape de polymérisation. La spécificité de la PCR est déterminée par le choix des amorces, celles-ci pouvant être sélectionnées en vue de détecter un groupe d'espèces, une espèce précise ou même un type de souches (par exemple vaccinales). La séquence d'ADN encadrée par les amorces est amplifiée exponentiellement en fonction du nombre de cycles effectués et devient prédominante ; elle peut donc être mise en évidence par migration sur un gel d'électrophorèse.

Deux tests de PCR, correspondant aux deux types de sondes nucléiques développées pour le diagnostic de la PPCB (voir ci-dessus) ont été mis au point.

Le premier test de PCR est basé sur la séquence CAP21 isolée de *Mmc*, qui est en fait une séquence commune à l'ensemble du groupe *mycoides* (37). En fonction des amorces sélectionnées dans cette séquence, ce test de PCR est spécifique du groupe *mycoides* ou spécifique de la sous-espèce *Mmm* (1, 12). Dans ce cas, une étape supplémentaire est nécessaire pour identifier le germe présent dans l'échantillon. Cette identification est basée sur la présence de sites de restriction au sein de la séquence amplifiée. *Mmm* SC possédant dans cette séquence des sites *Asn*I spécifiques, cette enzyme sera utilisée pour couper la séquence amplifiée, établissant ainsi un profil de digestion spécifique de ce mycoplasme. Cette étape supplémentaire pour atteindre l'identification de *Mmm* SC comporte ainsi un certain risque, puisque l'identification repose sur la présence ou l'absence de quelques nucléotides définissant un site de restriction.

Le second test de PCR a été développé à partir de la séquence spécifique de *Mmm* SC isolée de la banque génomique (7). Les deux amorces sélectionnées dans cette séquence amplifient spécifiquement l'agent de la PPCB (8). Aucune étape additionnelle n'est nécessaire à l'identification. Cependant, pour confirmer le diagnostic ou augmenter la sensibilité de détection, une digestion enzymatique (*Mmm* SC présente dans ce cas un profil *Ase*I spécifique) ou une hybridation du

produit de PCR peuvent être effectuées. Les résultats d'un test de PCR peuvent être obtenus en moins de huit heures. Deux jours sont en revanche nécessaires si une seconde étape (digestion enzymatique ou hybridation) est ajoutée. La sensibilité est d'environ 10 à 100 unités formant colonies (UFC) par aliquote prélevée d'échantillon. La sensibilité peut être améliorée jusqu'à détecter une seule UFC présente, lorsqu'une étape d'hybridation est effectuée sur le produit de PCR (8).

La technique de PCR offre de nombreux avantages, parmi lesquels la rapidité, la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité ; de plus, de nombreux échantillons peuvent facilement être traités simultanément. Un autre avantage est que la PCR est directement applicable sur un échantillon de terrain, ce qui représente une amélioration majeure par rapport à la plupart des tests précités. Un prélèvement en milieu liquide (prélèvement pleural ou exsudat pulmonaire) peut être traité directement, une simple dénaturation d'une fraction aliquote (incubation en eau bouillante) est nécessaire et aucune étape d'extraction de l'ADN n'est indispensable. Comme cela a été précisé précédemment, ce type de prélèvement présente l'intérêt de pouvoir être conservé sous forme de papiers filtre imbibés. Ceux-ci, une fois séchés, peuvent être envoyés sous enveloppe à un laboratoire compétent. Des fragments de poumon peuvent également être traités. Après broyage et centrifugation à basse vitesse, une aliquote est prélevée, dénaturée et soumise à la PCR. Si cela est nécessaire, la PCR peut également être réalisée sur du sang ou de l'urine.

La PCR présente aussi l'avantage de rester efficace quel que soit l'état de l'échantillon (dégradé, contaminé ou prélevé après traitement aux antibiotiques), c'est-à-dire, même lorsque l'agent pathogène n'est plus viable, à condition que suffisamment d'ADN soit présent dans l'échantillon.

Le développement de la PCR représente une amélioration importante dans le diagnostic de la PPCB ; elle répond à la plupart des critères exigés et constitue donc un outil de choix.

La PCR présente, toutefois, quelques inconvénients limitant son utilisation à certains laboratoires bien équipés et à un personnel bien entraîné. Ces inconvénients sont, d'une part, le coût de l'équipement nécessaire à la réalisation de la technique ; d'autre part, du fait précisément de la nature de la PCR, la capacité d'amplification exponentielle qu'apporte cette méthode implique de travailler avec beaucoup de précautions pour éviter tout risque de contamination des solutions ou des échantillons avec de l'ADN exogène. Par conséquent, les règles de travail définies pour cette technique doivent être rigoureusement suivies.

Epidémiologie moléculaire

Jusqu'à présent, aucun test ne permettait de différencier génétiquement les souches de *Mmm* SC et plus particulièrement les souches vaccinales, le biotype *Mmm* SC ayant toujours été présenté comme un ensemble de souches parfaitement homogène. L'étude des gènes codant pour l'acide ribonucléique (ARN) ribosomique 16S est, généralement, la technique de choix pour le typage génétique. Les mycoplasmes étant caractérisés par la présence d'un seul ou de deux gènes ARN 16S de faible polymorphisme, cette méthode n'est pas applicable. Par conséquent, les recherches se sont orientées vers d'autres marqueurs génétiques caractérisant *Mmm* SC. Une séquence ADN particulière correspondant à une séquence d'insertion, dénommée IS1296, a été mise en évidence chez ce mycoplasme (11). Une méthode de typage des souches de *Mmm* SC a donc été développée, basée sur le polymorphisme généré par

les variations en nombre et position sur le chromosome de la séquence IS1296. Ce polymorphisme est révélé par hybridation de l'ADN génomique digéré par l'enzyme *HindIII*, avec une sonde constituée de la séquence IS1296 marquée à la digoxigénine. Des profils variables ont été obtenus pour les différentes souches de *Mmm* SC testées (4). Des groupes ont ainsi pu être distingués entre les souches provenant d'Europe et celles prélevées en Afrique ou en Australie. De plus, cette technique a permis de définir un profil particulier pour les souches vaccinales, ce qui devrait être d'une grande utilité. L'utilisation de la séquence IS1296 représente donc un outil potentiel intéressant pour une étude de génotypage et d'épidémiologie moléculaire.

DIAGNOSTIC INDIRECT (SÉROLOGIQUE)

Pour le diagnostic indirect, les techniques sérologiques classiques de mise en évidence des anticorps anti-*Mmm* SC (séro-agglutination sur lame, agglutination de particules de latex sensibilisées, fixation du complément), bien qu'encore très largement utilisées, y compris comme méthodes de référence, cèdent progressivement le pas aux techniques immuno-enzymatiques souvent plus spécifiques et surtout plus sensibles. Le développement des anticorps monoclonaux a également considérablement amélioré la spécificité et la sensibilité du diagnostic sérologique.

Une synthèse des différentes techniques sérologiques actuellement disponibles pour le diagnostic de la PPCB a été publiée récemment (34), mais seules trois d'entre elles retiennent l'attention des utilisateurs.

Test de séro-agglutination sur lame

La séro-agglutination sur lame s'effectue avec un antigène coloré (18) ; il s'agit d'un test qualitatif dont les résultats positifs sont fiables pendant la phase aiguë de la maladie. Ce test présente l'avantage d'être un véritable test de terrain puisqu'il peut être utilisé directement sur le sang de l'animal, grâce à l'anticoagulant contenu dans l'antigène.

Toutefois, il convient d'être prudent lors de l'interprétation des résultats : les réactions faussement négatives sont nombreuses, en raison de la faible sensibilité du test (animaux en incubation, porteurs chroniques), ainsi que les réactions faussement positives (animaux âgés).

Bien qu'abandonné pour ces raisons, ce test reste valable pour confirmer un foyer récent en cours d'évolution, aux deux conditions suivantes :

- interprétation raisonnée des résultats,
- utilisation pour un diagnostic de troupeau et non pour un diagnostic individuel.

Réaction de fixation du complément

La réaction de fixation du complément, décrite par Campbell et Turner (3) et adaptée ultérieurement en microméthode, est la technique recommandée par l'Office international des épizooties (OIE) (21). Depuis de nombreuses années, la fixation du complément demeure la technique la plus populaire pour le diagnostic de la PPCB. Cette méthode, bien que peu sensible, a permis à différents pays comme l'Australie d'établir un programme d'éradication qui s'est avéré particulièrement efficace (30).

Le principe de la réaction est le suivant : une quantité définie de complément de cobaye est ajoutée à un mélange d'antigène et de sérum. Si le sérum contient des anticorps, ceux-ci réagiront avec l'antigène, entraînant la fixation du complément sur le complexe antigène-anticorps. En revanche, si le sérum ne contient pas d'anticorps, le complément reste disponible et sera mis en évidence par addition d'un système hémolytique. Le complément libre réagissant alors avec le complexe hématies-anticorps anti-hématies entraînera une hémolyse – laquelle, par contre, n'aura pas été observée dans le premier cas (présence d'anticorps anti-*Mmm* SC).

Les anticorps fixant le complément apparaissent dès le dixième jour après le début de la maladie clinique et persistent plusieurs mois.

Pendant la phase aiguë de la maladie, la spécificité de ce test est de l'ordre de 99% et sa sensibilité de 100 % ; un animal ne peut donc pas échapper au dépistage. Toutefois, au fur et à mesure que les animaux entrent en phase chronique, la spécificité de la réaction tombe à 70-80 % et les fausses réactions négatives ne sont pas rares. Chez les animaux vaccinés la réaction est positive pendant les trois à six mois suivant la vaccination. La fréquence des réactions faussement négatives peut augmenter du fait d'interventions thérapeutiques (antibiothérapie, corticothérapie) ou prophylactiques (abattage partiel des animaux infectés) mal conduites. Cependant, lorsqu'il est correctement appliqué et interprété, ce test présente un grand intérêt pour le dépistage de foyers de PPCB dans des zones où la vaccination a été pratiquée, car les anticorps vaccinaux n'entraînent pas de fixation du complément après un délai de trois à six mois.

Comme pour le test précédent, la réaction de fixation du complément doit être utilisée pour le dépistage de troupeaux infectés et en aucun cas pour un diagnostic individuel (30).

Si la mise en œuvre du test classique était fastidieuse et rendait difficile le traitement de nombreux échantillons, l'utilisation de la microméthode résout ce problème et permet de réduire les coûts. (Le protocole de cette microméthode est disponible en français ou en anglais auprès du Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Département d'élevage et de médecine vétérinaire, Montpellier, France.)

Les tests immuno-enzymatiques

Un premier test ELISA direct a été décrit en 1979 (23). Ce test utilisant des mycoplasmes (*Mmm* SC) entiers purifiés comme antigène présentait un taux relativement important de résultats faussement positifs. Depuis, de nombreux autres tests ELISA ont été développés, dont celui de Le Goff et Lefèvre (15) ; basé sur l'utilisation de *Mmm* SC soniqués, ce test conduisait à une meilleure distinction entre animaux infectés et animaux non infectés, mais présentait encore un taux élevé de résultats faussement positifs.

Un test ELISA de blocage a été développé à partir d'un anticorps monoclonal dirigé contre *Mmm* SC (17). Cependant, ce test présente une faible spécificité et reconnaît tous les membres du groupe *mycoides*. A partir de ce même anticorps monoclonal, un test ELISA de capture, conduisant donc à un diagnostic direct, est en cours d'évaluation dans le but de définir son niveau de spécificité et de sensibilité (16).

Un kit ELISA de compétition a été développé pour la détermination du taux d'anticorps anti-*Mmm* SC dans un liquide biologique (C. Le Goff, communication

personnelle). Ce test est basé sur la compétition, pour la fixation sur « l'antigène » *Mmm* SC, entre un anticorps monoclonal anti-*Mmm* SC et les anticorps présents dans l'échantillon biologique. Cet antigène est une suspension membranaire obtenue après traitement à la digitonine, suivi par une lyse osmotique d'une culture jeune d'une souche sauvage de *Mmm* SC. La révélation est obtenue par fixation d'un anticorps anti-immunoglobuline de souris marqué à la peroxydase et addition du substrat chromogène. La présence d'anticorps anti-*Mmm* SC dans le prélèvement bloque la fixation de l'anticorps monoclonal, ce qui entraîne une réduction de la réaction colorée. Ce test est actuellement en cours de validation, sous l'égide du laboratoire de référence de l'OIE pour les techniques ELISA et dérivées (Agence internationale de l'énergie atomique, Vienne, Autriche), par des laboratoires africains et européens.

Un deuxième test ELISA de compétition a été développé par Brocchi et coll. à partir d'anticorps monoclonaux spécifiques de *Mmm* SC et utilise une culture inactivée de la souche de référence de *Mmm* SC (PG1) comme antigène (2). Ces auteurs ont réalisé une étude comparative avec la réaction de fixation du complément pour la détection d'anticorps spécifiques dans le sérum de troupeaux infectés. Ils obtiennent un taux de corrélation de 93,5 %. Ce test élimine les problèmes de réactions faussement positives obtenues parfois avec la fixation du complément et présente une bonne sensibilité.

Les trois techniques de diagnostic indirect sont d'une utilité certaine lorsqu'elles sont bien exécutées et sous réserve d'une interprétation raisonnée des résultats. La séro-agglutination sur lame, d'exécution facile, réalisable sur le terrain, donne une réponse en quelques minutes et devrait être employée pour aider au diagnostic lors de foyers d'apparition récente. La fixation du complément reste encore valable quand elle est utilisée pour l'objectif pour lequel elle a été conçue, à savoir l'éradication de la maladie au sein des troupeaux contaminés. Les tests ELISA, très prometteurs, semblent pouvoir apporter une amélioration certaine de par leur sensibilité, spécificité et fiabilité ; de plus, ils peuvent facilement être réalisés à grande échelle. Les laboratoires ne sont donc pas démunis lorsqu'ils ont à réaliser un diagnostic sérologique de la PPCB, même si les techniques actuellement disponibles ont des limites et s'il reste nécessaire d'interpréter les résultats avec précaution.

CONCLUSION

Le diagnostic de la PPCB est relativement simple, dans la phase aiguë de la maladie, tant sur le plan clinique que lésionnel. En revanche, la détection des formes subaiguës et le dépistage des porteurs chroniques (d'origine naturelle : 10 % des animaux guéris ou après traitement par des antibiotiques) restent problématiques. Sur un animal isolé, l'observation de symptômes de broncho-pneumonie ou de pleuropneumonie aiguë doit alerter le clinicien, qui devra tenir compte du contexte épidémiologique avant d'ordonner ou non un traitement antibiotique. Lors d'une suspicion de foyer en zone d'enzootie, le clinicien devra observer le plus grand nombre d'animaux afin de détecter les malades (faire lever et courir les animaux, ausculter soigneusement ceux qui extériorisent des signes d'essoufflement ou des plaintes expiratoires). Il convient de ne pas oublier de rechercher les symptômes d'arthrite chez les jeunes. Il faut également toujours réaliser plusieurs autopsies, en s'attardant sur une palpation soigneuse des poumons. Il est aussi souhaitable d'effectuer sur place le test de séro-agglutination sur lame qui peut se révéler une aide au diagnostic sur l'ensemble du troupeau. Enfin, le

recours au laboratoire étant toujours indispensable, il convient d'effectuer le maximum de prélèvements sur plusieurs animaux. En effet, d'une part la réalisation de différents tests est généralement conseillée pour confirmer le diagnostic de PPCB et, d'autre part, certains tests ne doivent être utilisés que dans le contexte d'un troupeau et non pour le diagnostic individuel.

Jusqu'à présent, les tests classiques utilisés au laboratoire, que ce soit pour le diagnostic direct (isolement, culture, biochimie, inhibition de croissance ou immunofluorescence) ou indirect (la seule technique de référence étant la réaction de fixation du complément) présentaient de nombreux inconvénients : le manque de spécificité et de sensibilité, la nécessité, le plus souvent, d'isoler préalablement le germe (rendant impossible leur utilisation directe sur un prélèvement) et le fait qu'aucun des tests sérologiques ne permet, à lui seul, de détecter un animal infecté quel que soit le stade clinique de la maladie. Il est clair que les problèmes d'identification de l'agent pathogène de la PPCB sont dus principalement à son appartenance au groupe *mycoides*. Les six mycoplasmes, génétiquement très proches, qui constituent ce groupe étant définis par de nombreux caractères morphologiques, biologiques, biochimiques ou antigéniques communs, ces derniers interfèrent considérablement dans les tests sérologiques. Les réactions croisées sont particulièrement fréquentes entre les biotypes caprin et bovin de *M. mycoides* subsp. *mycoides*.

Résoudre ces divers problèmes nécessitait donc de disposer de nouveaux outils pour le diagnostic de la PPCB, qui soient plus spécifiques et plus sensibles. Ceux-ci ont pu être obtenus à partir des nouvelles techniques issues de l'évolution de la biologie moléculaire dans le domaine de la génétique ou des protéines. De ce développement sont nés deux types de tests qui ont pris un essor considérable dans le domaine du diagnostic : ceux basés sur la PCR et ceux utilisant les techniques immuno-enzymatiques couplées à des anticorps monoclonaux. Les techniques PCR et ELISA ont considérablement amélioré la spécificité et la sensibilité des tests de diagnostic.

Dans le domaine de la PPCB, si les nouveaux tests développés pour le diagnostic direct ou indirect ne remplissent pas toutes les conditions définissant un bon outil de diagnostic, ils apportent néanmoins, pour la plupart, des avantages incontestables par rapport aux méthodes classiques. Mais ceux qui répondent le mieux aux critères posés sont effectivement les tests PCR et ELISA. La PCR est une réaction simple, rapide, d'une très grande sensibilité et parfaitement reproductible. De plus, lorsqu'elle est basée sur une séquence d'ADN caractéristique de l'agent pathogène recherché, en l'occurrence *Mmm* SC, elle est spécifique de cet agent. Ce test permet de détecter *Mmm* SC directement dans un prélèvement (liquide pleural, fragments de poumon, etc.), le plus souvent sans traitement préalable et quel que soit l'état de l'échantillon (dégradé, contaminé ou prélevé après antibiothérapie). De plus, de nombreux échantillons peuvent facilement être traités dans le même temps. Toutefois, un bon outil de diagnostic doit pouvoir être accessible à tout laboratoire, ce qui pour l'instant n'est pas le cas de cette technique et représente sa principale contrainte. En effet, bien que le développement considérable des tests de PCR ait entraîné une baisse importante du coût de l'équipement, baisse qui devrait d'ailleurs se poursuivre, ce coût reste encore trop élevé pour certains laboratoires. Les techniques ELISA, parfaitement accessibles, ne présentent pas cet inconvénient, la plupart des laboratoires étant équipés du lecteur nécessaire. De plus, les tests ELISA sont simples, rapides et fiables. Si les tests ELISA directs étaient peu spécifiques, leur spécificité pour le diagnostic de la PPCB a été considérablement améliorée par l'utilisation d'anticorps monoclonaux

et par le développement de tests ELISA « sandwich » et de compétition. Cependant, la spécificité et la sensibilité du test dépendant essentiellement du choix et de la spécificité des anticorps monoclonaux utilisés dans la réaction, les résultats obtenus sont variables selon les tests développés. Un des tests ELISA « sandwich » décrits pour la PPCB remplit ces conditions de spécificité et de sensibilité mais présente l'inconvénient de n'être utilisable qu'à partir d'une culture. Ce test est en cours d'amélioration pour pouvoir détecter *Mmm* SC directement dans un prélèvement. De même, un test ELISA de compétition qui répond également aux critères de spécificité et de sensibilité est en cours de validation dans plusieurs pays par comparaison avec la réaction de fixation du complément. Compte tenu des limites de cette dernière méthode, le développement d'un meilleur outil de dépistage (les épreuves ELISA étant facilement réalisables à grande échelle) constituerait une amélioration certaine du diagnostic sérologique.

Il faut bien reconnaître cependant qu'aucun de ces tests ne résout le problème de la détection des porteurs chroniques, mais ce problème ne concerne pas la sensibilité des tests de diagnostic. Dans ce cas précis, aucune donnée ne permet d'affirmer qu'il y a réellement excrétion du mycoplasme ; en l'absence d'une telle excrétion, une autre approche devra être développée pour identifier les porteurs chroniques.

Le diagnostic expérimental s'est donc enrichi de deux techniques nouvelles très prometteuses, la PCR et l'ELISA, adaptées à la détection directe ou sérologique de *Mmm* SC. Si pour chacun de ces tests quelques problèmes restent à résoudre, ils apportent en tout cas une amélioration certaine par rapport aux techniques classiques. De plus, ils représentent un tel potentiel de développement qu'ils ouvrent la voie à un panel de techniques de détection qui ne pourront qu'affiner encore le diagnostic de la PPCB.

*
* *

DIAGNOSIS OF CONTAGIOUS BOVINE PLEUROPNEUMONIA: PROBLEMS AND NEW DEVELOPMENTS. – L. Dedieu, A. Bréard, C. Le Goff and P.-C. Lefèvre.

Summary: While it is easy to diagnose contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) in an animal in the acute clinical stage, subacute and chronic forms are more difficult to diagnose. Recourse to laboratory tests is essential to confirm any suspicion of CBPP. As standard diagnostic procedures (isolation, culture, biochemical tests, serological tests) are lacking in specificity and sensitivity, improvements are needed. Progress in molecular biology techniques has led to new tests, among which are the polymerase chain reaction (PCR) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using monoclonal antibodies. Application of these techniques to CBPP offers a number of advantages, and has considerably enhanced the specificity and sensitivity of diagnosis.

KEYWORDS: Cattle diseases – Contagious bovine pleuropneumonia – Diagnostic techniques – Enzyme-linked immunosorbent assay – *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC – Polymerase chain reaction.

*
* *

DIAGNÓSTICO DE LA PERINEUMONÍA CONTAGIOSA BOVINA: PROBLEMAS Y DESARROLLOS RECIENTES. – L. Dedieu, A. Bréard, C. Le Goff y P.-C. Lefèvre.

Resumen: El diagnóstico de la perineumonía contagiosa bovina (PCB), que no presenta mayor dificultad cuando se trata de animales en fase clínica aguda, es más problemático en las formas subagudas y crónicas de la enfermedad. Es entonces indispensable recurrir al laboratorio para obtener la confirmación de los casos sospechosos. Era necesario mejorar los métodos clásicos de diagnóstico de la PCB (aislamiento, cultivo, pruebas bioquímicas y serológicas) que faltaban de especificidad y de sensibilidad. Además, el desarrollo de la biología molecular ha permitido poner a punto nuevas pruebas. Entre las más importantes se destacan la reacción de polimerización en cadena (polymerase chain reaction: PCR) y las técnicas inmunoenzimáticas (enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) que utilizan anticuerpos monoclonales. Estas técnicas aplicadas a la PCB presentan múltiples ventajas y han aumentado considerablemente la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

PALABRAS CLAVE: Diagnóstico – *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC – Perineumonía contagiosa bovina – Prueba inmunoenzimática – Reacción de polimerización en cadena.

*
* *

REFERENCES

1. BASHIRUDDIN J.B., TAYLOR T.K. & GOULD A.R. (1994). – A PCR-based test for the specific identification of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* SC. *J. vet. Diagn. Invest.*, **6**, 428-434.
2. BROCCHI E., GAMBA D., POUMARAT F., MARTEL J.L. & DE SIMONE F. (1993). – Improvements in the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia through the use of monoclonal antibodies. In *Biotechnologie appliquée au diagnostic des maladies animales. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **12** (2), 559-570.
3. CAMPBELL A.D. & TURNER A.W. (1953). – Studies on contagious bovine pleuropneumonia of cattle. IV. An improved complement-fixation test. *Aust. vet. J.*, **29**, 154-163.
4. CHENG X., NICOLET J., POUMARAT F., REGALLA J., THIAUCOURT F. & FREY J. (1995). – Insertion element ISJ296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony identifies a European clonal line distinct from African and Australian strains. *Microbiology*, **141**, 3221-3228.
5. CLYDE W.A. (1964). – *Mycoplasma* species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J. Immunol.*, **92**, 958-965.
6. CURASSON G. (1942). – *Traité de pathologie exotique vétérinaire et comparée. Tome II. Maladies microbiennes.* Vigot Frères, Paris, 688 pp.
7. DEDIEU L., BRÉARD A., BENSALD A. & LEFÈVRE P.-C. (1992). – Development of species-specific DNA probes for *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *IOM Letters*, **2**, 203.

8. DEDIEU L., MADY V. & LEFÈVRE P.-C. (1994). – Development of a selective polymerase chain reaction assay for the detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (contagious bovine pleuropneumonia agent). *Vet. Microbiol.*, **42**, 327-339.
9. FERRONHA M.H., NUNES-PETISCA J.L., SOUSA FERREIRA H., MACHADO M. & REGALLA J. (1988). – Localização de antígenios *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* nas lesões do pulmão de bovinos com peripneumonia. *Rep. Trab. LNIIV* (número spécial), 25-36.
10. FREUNDT E.A., ANDREWS B.E., ERNO H., KUNZE M. & BLACK F.T. (1973). – The sensitivity of *Mycoplasmatales* to sodium-polyanethol-sulfonate and digitonin. *Zentbl. Bakt. ParasitKde*, **A225**, 104-112.
11. FREY J., CHENG X., KUHNERT P. & NICOLET J. (1995). – Identification and characterization of IS1296 in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and presence in related mycoplasmas. *Gene*, **160**, 95-100.
12. HOTZEL H., SACHSE K. & PFÜTZNER H. (1996). – A PCR scheme for differentiation of organisms belonging to the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Vet. Microbiol.*, **49**, 31-43.
13. HUDSON J.R. (1972). – La péripneumonie contagieuse des Bovidés. Etudes agricoles de l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), n° 86. FAO, Rome, 132 pp.
14. LEACH R.H., COSTAS M. & MITCHELMORE D.L. (1989). – Relationship between *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* ('large-colony' strains) and *M. mycoides* subsp. *capri*, as indicated by numerical analysis of one-dimensional SDS-PAGE protein patterns. *J. gen. Microbiol.*, **135**, 2993-3000.
15. LE GOFF C. & LEFÈVRE P.-C. (1989). – Péripneumonie contagieuse bovine : test immunoenzymatique et cinétique d'apparition des anticorps au cours d'une infection expérimentale. Relation entre la fixation du complément, l'excrétion et la recherche de l'antigène circulant. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **42**, 365-369.
16. MARINI C., MIA G.M. DE, CENCI T., SCUOTO T. & FRESCURA T. (1992). – Applicazione della ELISA mediante uso anticorpi monoclonali per la evidenzione dell'antigene di *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (sc) in polmoni di bovini infetti. In Proc. XLVI Convegno Nazionale Società Italiana Scientifica Veterinaria, Venice.
17. MIA G.M. DE, MARINI C., VITELLI B.T., BATTISTACCI L., FORTUNATI M. & FRESCURA T. (1993). – Uso degli anticorpi monoclonali per la diagnosi sierologica della pleuropolmonite contagiosa dei bovini. *Selez. vet.*, **34**, 867-874.
18. NEWING C.R. & FIELD A.C. (1953). – A preliminary report on a rapid test for bovine contagious pleuropneumonia. *Br. vet. J.*, **109**, 397-404.
19. NICHOLAS R.A.J. & PALMER N.M.A. (1994). – Contagious bovine pleuropneumonia in Europe. *State vet. J.*, **4**, 14-16.
20. NICHOLAS R.A.J. & BASHIRUDDIN J.B. (1995). – *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (small colony variant): the agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the '*Mycoplasma mycoides* cluster'. *J. comp. Pathol.*, **113** (1), 1-27.
21. OFFICE INTERNATIONAL DES ÉPIZOOTIES (OIE) (1992). – Contagious bovine pleuropneumonia. In Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 2^e éd. OIE, Paris, 47-56.
22. OLSSON B., BÖLSKE G., BERGSTRÖM K. & JOHANSSON K.E. (1990). – Analysis of caprine mycoplasmas and mycoplasma infections in goats using two-dimensional electrophoresis and immunoblotting. *Electrophoresis*, **11**, 861-869.

23. ONOVIRAN O. & TAYLOR-ROBINSON D. (1979). – Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* in cattle by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Rec.*, **105**, 165-167.
24. PERREAU P. (1980-1981). – Les mycoplasmes. *In* Cours de Microbiologie systématique. Institut Pasteur, Paris.
25. PERREAU P. (1981). – Les formes L. *In* Cours de Bactériologie systématique. Institut Pasteur, Paris.
26. PERREAU P., GAYT P. & MONNIER J. (1969). – La méthode d'immunofluorescence et l'identification des mycoplasmes. Application au diagnostic de la péripneumonie. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **22** (4), 481-493.
27. POLAK-VOGELZANG A.A., HAGENAAERS R. & NAGEL J. (1978). – Evaluation of an indirect immunoperoxidase test for identification of *Acholeplasma* and *Mycoplasma*. *J. gen. Microbiol.*, **106**, 241-249.
28. POUMARAT F., PERRIN B. & LONCHAMBON D. (1991). – Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). *Vet. Microbiol.*, **29**, 329-338.
29. PROVOST A. (1972). – Recherches immunologiques sur la péripneumonie. XIV. Description de deux techniques applicables sur le terrain pour le diagnostic de la maladie. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, **25** (4), 475-496.
30. PROVOST A., PERREAU P., BRÉARD A., LE GOFF C., MARTEL J.L. & COTTEW G.S. (1987). – Péripneumonie contagieuse bovine. *In* Les mycoplasmoses des ruminants. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **6** (3), 565-624.
31. RAZIN S. (1983). – Morphology and ultrastructure. *In* Methods in mycoplasmaology. Mycoplasma characterization (S. Razin & J.G. Tully, éd.). Academic Press, Londres & New York, 29-90.
32. RODRIGUEZ F., BALL H.J., FINLAY D., CAMPBELL D. & MACKIE D.P. (1996). – Detection of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* by monoclonal antibody-based sandwich ELISA. *Vet. Microbiol.*, **51**, 69-76.
33. ROSENDAL S. (1984). – Effects of the caprine variant of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* on endothelium, monocytes and complement of guinea pig, calf, sheep and goat serum. *Am. J. vet. Res.*, **45** (11), 2396-2402.
34. RURANGIRWA F.R. (1995). – Uses of serology for the diagnosis of contagious bovine pleuropneumonia. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **14** (3), 603-609.
35. SCANZIANI E., SIRONI G., FINAZZI M., GRIECO V., PALTRINIERI S. & MANDELLI G. (1991). – Alterazioni linfonodali in corso di pleuropolmonite contagiosa del bovino (PPCB). *Atti Soc. ital. Buiatria*, **23**, 417-429.
36. SHIFRINE M. (1967). – A rapid gel diffusion precipitin test for bovine contagious pleuropneumonia. *J. Wildl. Dis. Assoc.*, **3**, 36.
37. TAYLOR T.K., BASHIRUDDIN J.B. & GOULD A.R. (1992). – Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. *Int. J. syst. Bacteriol.*, **42** (4), 593-601.
38. TRICHARD C.J.V., BASSON P.A., LUGT J.J. VAN DER & JACOBSZ E.P. (1989). – An outbreak of contagious bovine pleuropneumonia in the Owambo Mangetti area of South West Africa/Namibia: microbiological, immunofluorescent, pathological and serological findings. *Onderstepoort J. vet. Res.*, **56**, 277-284.

39. TURNER A.W. (1959). – Bovine contagious pleuropneumonia. *In* Infectious diseases of animals. Diseases due to bacteria (A.W. Stableforth & I.A. Galloway, édit.). Butterworth, Londres, 437-463.
 40. TURNER A.W. (1962). – Detection of *Mycoplasma mycoides* antigens and antibody by means of precipitin tests as aids to diagnosis of bovine contagious pleuropneumonia. *Aust. vet. J.*, **38**, 335-337.
 41. WHITE G. (1958). – Agar double diffusion precipitation reaction applied to the study of *Asterococcus mycoides*. *Nature*, **181**, 278-279.
-